中華農業研究（Jour. Agric. Res. China）43(3)：308～319（1994）

繼代培養對康乃馨試管苗玻璃質化的影響[1]

古新梅　　蔡新聲[2]

摘要：利用康乃馨組織培養所繁殖的枝條，探討繼代培養代數對試管苗玻璃質化的影響，結果發現在不同的洋菜、BA 及 NH_4^+／NO_3^- 等不同成分及濃度的培養基測試中，經四次繼代培養後之康乃馨試管苗，玻璃質化程度均較第一代之試管苗高出許多；不管第一代或第四代之康乃馨試管苗，均隨著洋菜濃度的減少、BA 濃度的增加及 NH_4^+／NO_3^- 比例的增加，而玻璃質化的程度有愈形嚴重之趨勢，因此選擇繼代培養代數較少之康乃馨枝條，進行組織培養之大量繁殖較爲有利。

關鍵詞：康乃馨（香石竹）、組織培養、玻璃質化。

玻璃質化（vitrification，glassification，glassiness or hyperhydric transformation）是植物組織培養過程中試管苗極爲常見的現象[6]，由於這些玻璃質化的試管苗移植土壤時存活率極低[8]，因此這種不正常的試管苗對組織培養的商業化，十分不利。

許多報告報導了組織培養玻璃質化形成原因，例如液態培養基[8]、無機養分如 NH_4^+ 的超適濃度（superoptimal concentrations）[26]、高濃度的 cytokinins[2,3,5]；低濃度的洋菜[6,10,27]、試管中高的相對濕度[29]及品種[4]等。

本文初期探討的方向以培養基組成分對康乃馨試管苗玻璃質化之影響[1]，結果發現除了培養基組成分外，繼代培養的代數亦扮演著重要的角色，本研究乃針對此一問題做進一步之探討。

材料和方法

一、材　料

本試驗所選用之材料，係採自田間康乃馨（*Dianthus caryophyllus* L. cv. Pinky）植株上之生長點及腋芽經接種於固體培養基中，每支試管含有 10ml 之培養基（表面積約 20cm^2），接種兩個腋芽或一個生長點，經數週培養成幼苗，並以每一個月間隔繼代培養一次以繁殖足夠之植株供爲試驗材料，本研究取第一代及第四代的枝條作爲試驗材料。

二、培養基成分及培養材料

接種康乃馨芽體培養基以 MS（Murashige & Skoog, 1962）[15]爲基本配方，其中鐵鹽及有機成分均維持全量，其餘無機成分則改爲半量，再添加 0.5ppm BA，3％蔗糖及0.9％洋菜（Difco agar），pH 調至5.7±0.1（簡稱 CN 培養基），以121°C、15 lb／in^2（1.05 kg／cm^2）之高溫高壓殺菌後，放冷備用。

---

1. 臺灣省農業試驗所　研究報告第 1732 號。
2. 本所農藝系助理及研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

培養基成分之測試則以上述 CN 培養基爲主，依試驗項目之不同而改變其組成分，其中洋菜試驗以0.6、0.9、1.2、1.5%之 Difco agar 及0.25% Gelrite 來比較其玻璃質化的情形；cytokinins 以 0、0.5、1、2、4 ppm 的 BA 來作比較；硝酸態氮與銨態氮之比例則以1：2、1：1、2：1、4：1、8：1及16：1的處理，來比較不同代數之枝條其玻璃質化的情形。試驗用培養容器爲 500ml 三角瓶，含100ml 培養基，其內接種四株康乃馨的幼苗。接種後置於25±1°C 之恆溫，以每日16小時照光（光強約 2,000lux）培養。

培養數週後，觀察各試驗枝條之玻璃質化情形。玻璃質化枝條之判別係以肉眼觀察，葉片呈水浸透明狀爲準，記錄各試驗之玻璃質化枝條。上述各試驗中每個處理含40個重覆，將觀察所得之數據取其平均值，並計算已玻璃質化枝條所佔比率及標準偏差，以 Sigma Plot 之電腦程式繪出圖形，比較處理間之差異；形成枝條則以 Duncan's multiple range test 測定處理間之差異。

結　果

一、不同代數之枝條培養在不同種類及濃度的 agar 培養基之結果

圖1顯示第一代的康乃馨枝條經30天培養，玻璃質化程度以0.25%gelrite 的處理60%最嚴重，其次爲0.6% agar 之17%，而0.9、1.2及1.5%agar 爲17%、8%及6%。圖2顯示第四代的康乃馨枝條經30天培養，玻璃質化程度以0.25% gelrite 的處理爲97%最嚴重，其次爲0.6% agar 之78%，而0.9、1.2及1.5% agar 爲66%、39%及38%。以上資料顯示隨著 agar濃度的增加，其玻璃質化的條枝比例逐漸減少，而且第四代康乃馨枝條之玻璃質化程度較第一代嚴重許多。表1係第一代的康乃馨枝條培養於不同 agar 培養基中，30天後形成許多枝條之結果，表2則係第四代的康乃馨枝條，培養於不同 agar 培養基中，30天後形成許多枝條之結果，顯示二種材料均隨 agar 濃度的提高而繁殖率遞減，兩者均顯示0.25%Gelrite 之培養基形成枝條數比 Difco agar 佳，但玻璃質化的程度也以 Gelrite 最嚴重。

表 1. 不同濃度及種類的洋菜對第一代康乃馨莖頂培養形成枝條的影響

Table 1. Effect of agar concentration on the carnation shoot production from first-generation shoot tips cultured in vitro

Basal medium* with agar (%)	No. of explants cultured	Average no. of adventitious shoots produced
0.6	40	10.9^{b}**
0.9	40	8.6^{c}
1.2	40	7.7^{c}
1.5	40	6.5^{c}
with gelrite		
0.25	40	14.7^{a}

* Basal medium：1/2 MS basic salts supplemented with 3%sucrose and 0.5 ppm BA, pH=5.7. Culture duration was 30 days. The percentage of vitrified shoots was shown in Fig. 1.

** Means followed by the same letter are not significantly different at 5% level using Duncan's multiple range test.

表 2. 不同濃度及種類的洋菜對第四代康乃馨莖頂培養形成枝條的影響

Table 2. Effect of agar concentration on the carnation shoot production from fourth-generation shoot tips cultured in vitro

Basal medium* with agar (%)	No. of explants cultured	Average no. of adventitious shoots produced
0.6	40	10.6[b]**
0.9	40	9.2[c]
1.2	40	9.1[c]
1.5	40	7.1[c]
with gelrite		
0.25	40	20.2[a]

* Basal medium : 1/2 MS basic salts supplemented with 3%sucrose and 0.5 ppm BA, pH=5.7. Culture duration was 30 days. The percentage of vitrified shoots was shown in Fig. 2.
** Same as Table 1.

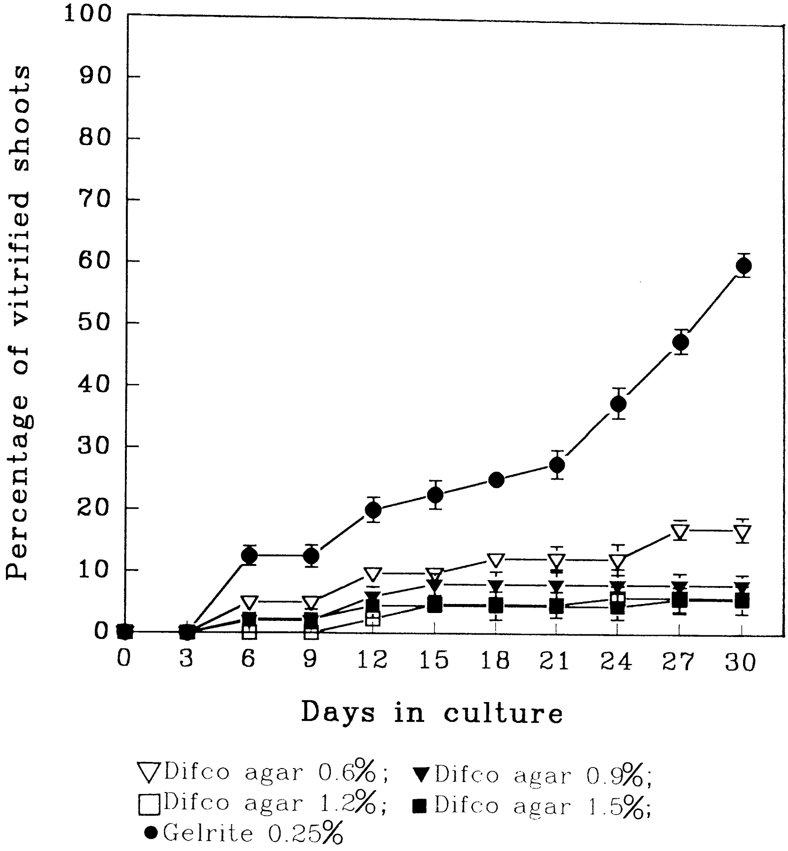

Fig. 1. Percentage of vitrified carnation shoots produced from first-generation shoot tips cultured in medium containing gelrite and agar of different concentrations.

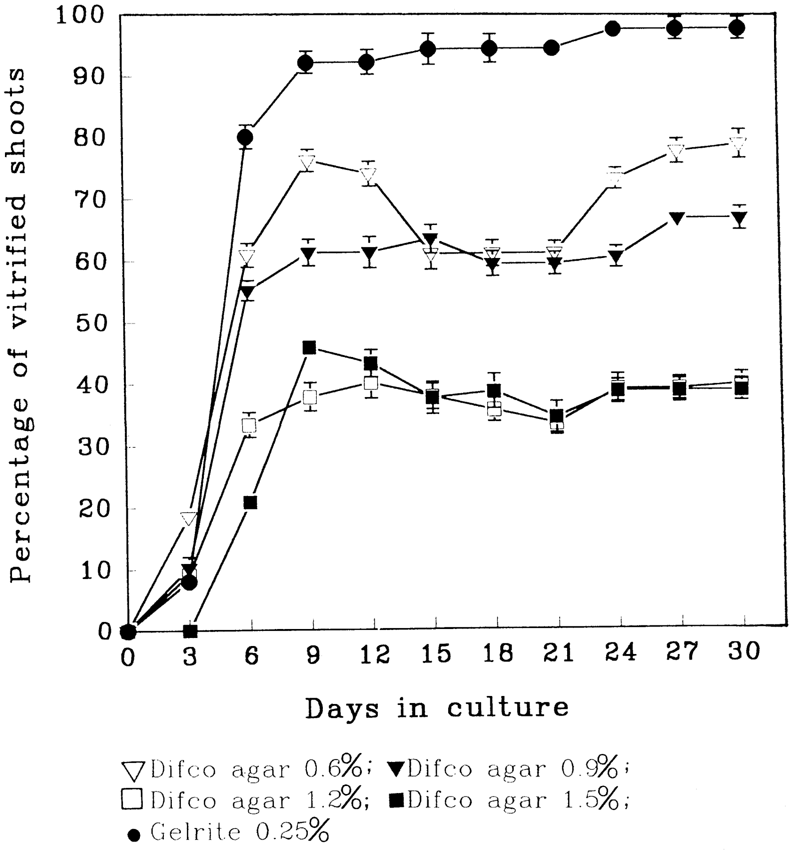

Fig. 2. Percentage of vitrified carnation shoots produced from fourth-generation shoot tips cultured in medium containing gelrite and agar of different concentrations.

二、不同代數之枝條培養在含不同 BA (6-benzylamino purine) 培養基之結果

在 BA 的試驗中發現第一代的康乃馨枝條培養至第30天時，4ppm BA 之玻璃質化枝條百分比爲17%、2ppm 爲14%、1ppm 爲 9 %、0.5ppm 爲 8 %，而不含BA 的培養基爲 6 % (圖 3) ；而第四代康乃馨枝條的玻璃質化百分比分別爲4ppm BA 之80%、2ppm 爲70%、1ppm 爲70%、0.5 ppm 爲66%，隨著 BA 濃度的減少，玻璃質化枝條的比例漸減，即使在不含 BA 的培養基玻璃質化亦高達55% (圖 4) ，顯示第四代康乃馨玻璃質化枝條比第一代高出許多。表 3 及表 4 分別爲第一代及第四代康乃馨枝條培養於不同濃度 BA 培養基中，30天後形成枝條之結果，顯示隨 BA 濃度增高枝條數漸增的趨勢，在低濃度的 BA 培養基 (<2ppm) ，第四代康乃馨枝條數較第一代稍高，但各處理枝條數差異並不十分明顯，而不含 BA 的培養基則差異明顯。

表 3. 不同濃度的 BA 對第一代康乃馨莖頂培養形成枝條的影響

Table 3. Effect of BA concentration on the carnation shoot production from first-generation shoot tips cultured in vitro

Basal medium* with agar (%)	No. of explants cultured	Average no. of adventitious shoots produced
0	40	7.0[b]**
0.5	40	8.6[ab]
1.1	40	8.9[ab]
2.0	40	9.2[ab]
4.0	40	10.2[a]

* Basal medium : 1/2 MS basic salts supplemented with 3%sucrose and 0.9% agar, pH=5.7. Culture duration was 30 days. The percentage of vitrified shoots was shown in Fig. 3.

** Same as Table 1.

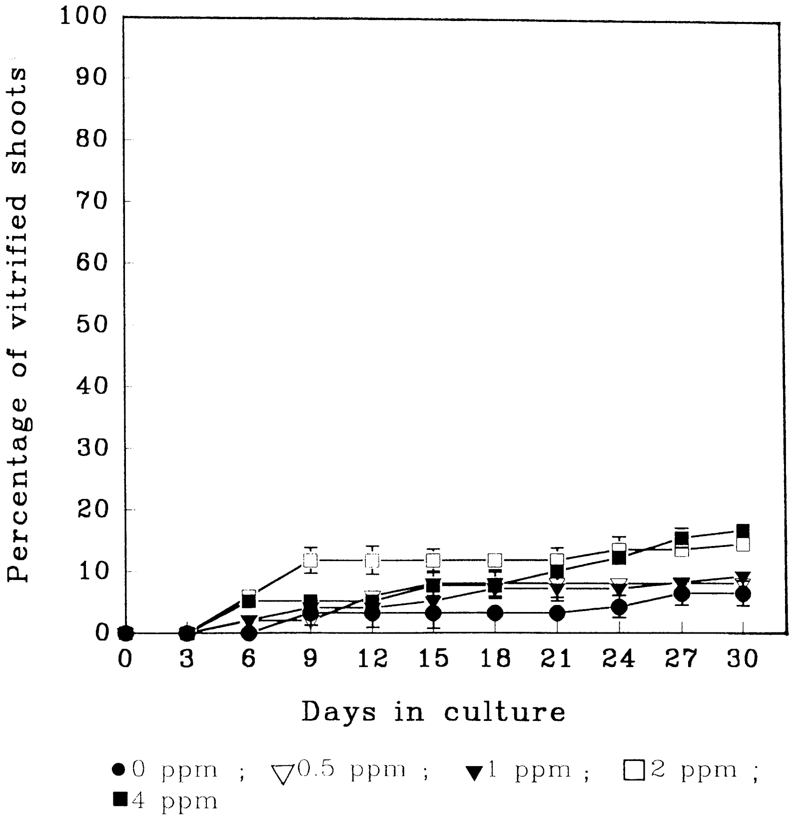

Fig. 3. Percentage of vitrified carnation shoots produced from first-generation shoot tips cultured in medium containing different BA concentrations.

表 4. 不同濃度的 BA 對第四代康乃馨莖頂培養形成枝條的影響

Table 4. Effect of BA concentration on the carnation shoot production from fourth-generation shoot tips cultured in vitro

Basal medium* with agar (%)	No. of explants cultured	Average no. of adventitious shoots produced
0	40	9.5[b]**
0.5	40	9.2[ab]
1.0	40	9.5[ab]
2.0	40	9.9[ab]
4.0	40	10.2[a]

* Basal medium : 1/2 MS basic salts supplemented with 3%sucrose and 0.9% agar, pH=5.7. Culture duration was 30 days. The percentage of vitrified shoots was shown in Fig. 4.
** Same as Table 1.

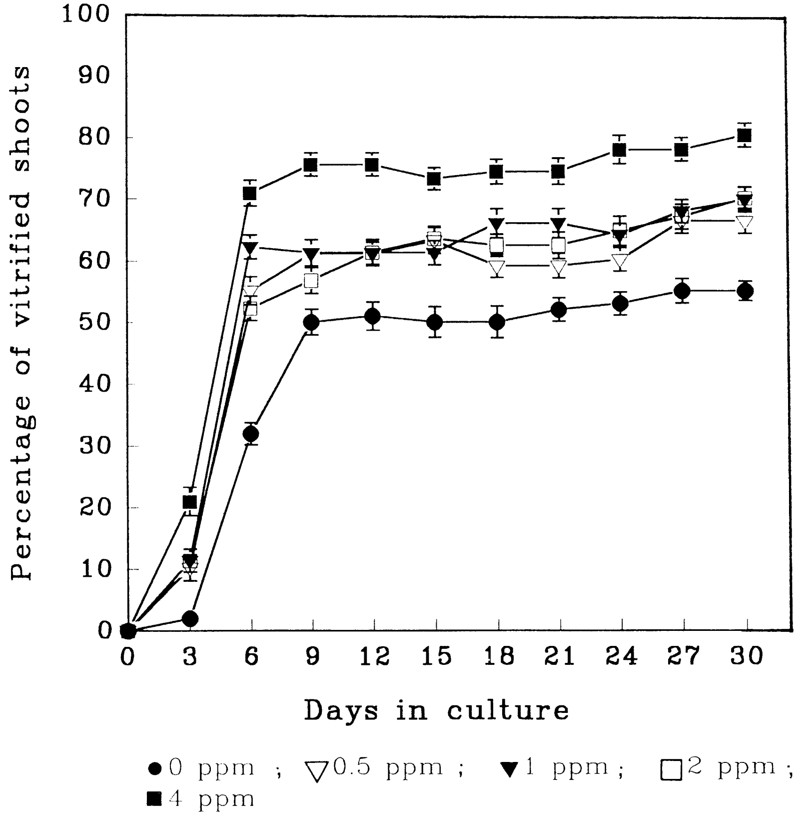

Fig. 4. Percentage of vitrified carnation shoots produced from fourth-generation shoot tips cultured in medium containing different BA concentrations.

三、不同代數之枝條培養在含不同比例的硝酸態氮：銨態氮培養基之結果

在 NO_3^-：NH_4^+ 的試驗中發現第一代的康乃馨枝條培養至第30天時，NO_3^-：NH_4^+=1：2之培養基玻璃質化枝條僅佔12%，其餘為1：1 (10%)、2：1 (8%)、4：1 (4%)、8：1 (8%) 及16：1 (8%)，玻璃質化情形均不甚嚴重（圖5）；第四代康乃馨枝條之玻璃質化結果為1：2 (33

%)、1：1 (36%)、2：1 (29%)、4：1 (5%)、8：1 (13%) 及16：1 (6%) (圖6)，顯示含有 NH_4^+ 離子較多時，其枝條玻璃質化情形較第一代的處理嚴重許多。表5及表6分別爲第一代及第四代的康乃馨枝條培養於不同比例的 NO_3^-：NH_4^+ 之培養基中，30天後形成枝條之結果，顯示 NO_3^-：NH_4^+ 比例過高不利於枝條形成，兩種材料均以 NO_3^-：NH_4^+=1：1~2：1間，最有利於康乃馨枝條培養之大量繁殖。

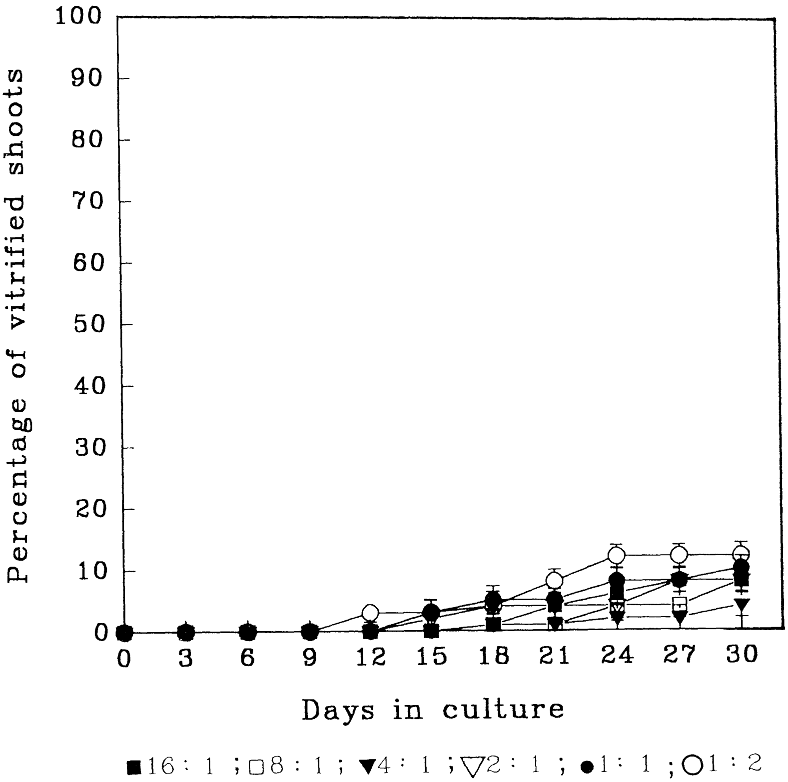

Fig. 5. Percentage of vitrified carnation shoots produced from first-generation shoot tips cultured in medium with different NO_3^- : NH_4^+ ratios.

表 5. 不同比例的 NO_3^-：NH_4^+ 對第一代康乃馨莖頂培養形成枝條的影響

Table 5. Effect of NO_3^- : NH_4^+ ratio on the carnation shoot production from first-generation shoot tips cultured in vitro

Basal medium* with NO_3^- : NH_4^+	No. of explants cultured	Average no. of adventitious shoots produced
1 : 2	25	7.0[a]**
1 : 1	25	8.5[a]
2 : 1	25	8.6[a]
4 : 1	25	8.0[a]
8 : 1	25	7.8[a]
16 : 1	25	7.1[a]

* Basal medium : 1/2 MS basic salts supplemented with 3%sucrose 0.9% agar, BA 0.5ppm pH=5.7. and cultured duration was 30 days. The percentage of vitrified shoots was shown in Fig. 5.
** Same as Table 1.

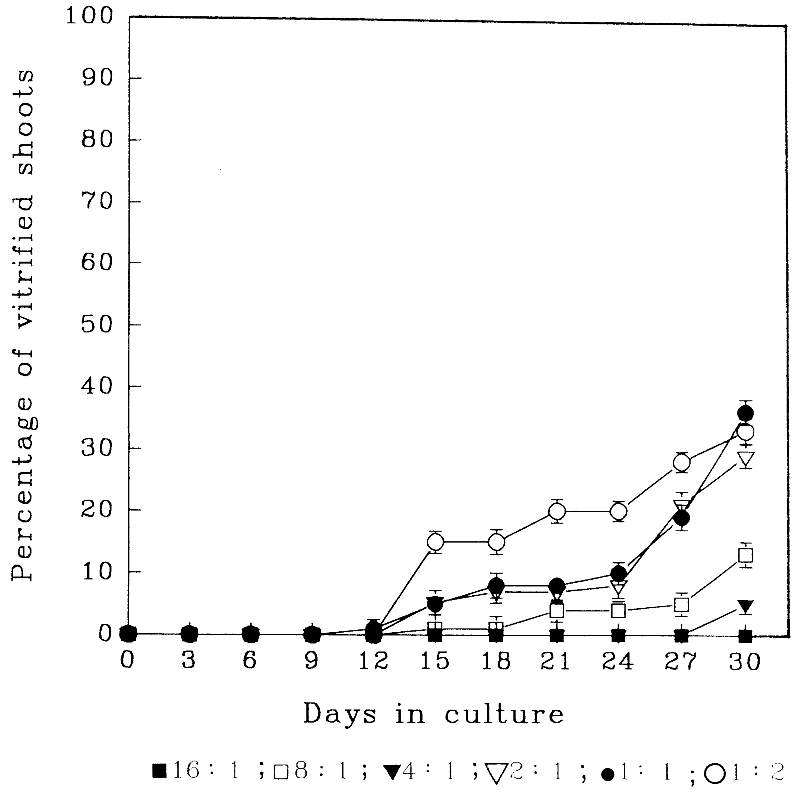

Fig. 6. Percentage of vitrified carnation shoots produced from fourth -generation shoot tips cultured in medium with different NO_3^- : NH_4^+ ratios.

表 6. 不同比例的 NO_3^- : NH_4^+ 對第四代康乃馨莖頂培養形成枝條的影響

Table 6. Effect of NO_3^- : NH_4^+ ratio on the carnation shoot production from fourth-generation shoot tips cultured in vitro

Basal medium* with NO_3^- : NH_4^+	No. of explants cultured	Average no. of adventitious shoots produced
1 : 2	40	4.6[c]**
1 : 1	40	8.2[a]
2 : 1	40	7.9[a]
4 : 1	40	6.0[b]
8 : 1	40	5.5[b]
16 : 1	40	4.9[c]

* Basal medium : 1/2 MS basic salts supplemented with 3%sucrose, 0.9% agar and 0.5ppm BA, pH= 5.7. Culture duration was 30 days. The percentage of vitrified shoots was shown in Fig. 6.
** Same as Table 1.

討 論

在過去十年中，所發表與瓶苗玻璃質化有關的報告至少八十篇以上，但是因爲玻璃質化發生的原

因牽涉甚廣，所以其中能提出有效控制玻璃質化的報告十分稀少。一般而言，造成玻璃質化的原因可由兩方面來探討，一是由於水分不斷被動地擴散到組織中；此種情形可藉著改變繁殖體位置，避免其葉片直接與培養基接觸，或減少培養瓶中之相對濕度加以改善。二是因代謝混亂所引起，這方面較難找出解決方法，因爲造成代謝混亂的因子很多，且常因爲繁殖的植物種類而產生極大差異；而且與玻璃質化有關之因子如無機養分、cytokinins 的濃度、洋菜的濃度、繼代培養的代數及品種等，又常與周圍環境如溫度、光源及相對濕度有很大關係[17]。以下僅提出與玻璃質化較確切相關的因子：

一、凝膠物質 (Gelling agent)

以量的觀點而言，agar 濃度低，其基質潛勢較高，養分有效性亦高，故枝條繁殖率較高。但培植體易吸收 BA 或其他易誘導玻璃質化的因子，所以玻璃質化程度較嚴重。以質的觀點而言，含 BA 之液體培養基或是含 gelrite 之固體培養基，其玻璃質化程度較 Difco agar 之固體培養基爲嚴重，而以液體培養基造成的玻璃質化最爲嚴重，可能是因爲天然 agar 含某些水解產物，可干擾玻璃質化之發生。在玻璃質化發生前兩天，可觀察到液體培養基之 pH 快速升高至 6－7 間，也可能因爲液體培養基中之離子吸收較容易，造成 pH 變化較大[18]，因此玻璃質化較嚴重。

二、Cytokinins

cytokinins 濃度較高或因洋菜濃度較低，使 cytokinins 有效性提高，而促使玻璃質化發生比例提高，其中又以人工合成之 cytokinins 例如 BA 效果較顯著[19]。Leshem[11]發現在瓜類（*Cucumis melo*）的組織培養中，當其他可接受的誘因（如含低濃度洋菜的培養基、高相對濕度及高濃度的氨態氮）存在下，若無 cytokinin 的存在則無法誘導出玻璃質化，所以認爲cytokinin 可稱爲玻璃質化的「primary factor」。Phan[21]亦發現 BA 的濃度與玻璃質化的程度成正比，以早先關於玻璃質化之試管苗缺乏木質素之報告爲基礎，他假設玻璃質化的起因是由cytokinin 所造成細胞分裂之不平衡狀況，而導致分化的一種干擾過程，尤其是在大多數新細胞中，木質素的合成很難繼續下去。此種由 Phan 所假設「分化的干擾過程」亦可解釋 Ziv[28]最近的發現，玻璃質化之增加與 cellulose 之合成減少有關，進一步造成細胞壁之硬度減低，且使水的吸收增加、細胞崩解、產生無功能性保衛細胞和角質層之缺乏等現象。McLaughlin and Karnosky[14]亦發現培養基中 cytokinin 濃度之減少，使落葉松屬植物（*Caryx decidua*）的組織培養試管苗，玻璃質化的頻度自70%降至30%，但此過程會造成枝條繁殖率的減少。

三、無機鹽類

在無機養分對玻璃質化的影響中，將 MS 基本培養基中氮源（NO_3^- 及 NH_4^+）的濃度降爲原來的1／2或1／3，可使 *Salix babylonica* 及 *Prunus avium* 二者之玻璃質化的比率均降低[2,22]，Beauchesne 發現，利用含銨態氮較少之 Knop's 基本培養基，可得到大量木質化良好的幼苗[2]，相似的結果亦見於 Letouze 和 Daguin 之報告[10]，故有人認爲組織培養的繁殖體，若自培養基吸收過量的氮易使體內 C／N ratio 降低，而導致木質素及纖維素的合成缺乏，進而產生玻璃質化的症狀。一般而言，MS 較其他培養基易誘導玻璃質化的發生，經證實與其含較高的 NH_4^+有關。植物吸收較多之 NH_4^+致 C／N 比例降低，而造成 cellulose 及lignin 合成減少，細胞之壁壓降低，而水份之吸入過多，故發生玻璃質化的現象[25]。其他鹽類之反應，如將 MS 基礎培養基中之 $CaCl_2$ 除去，則會使 *Prunus cerasus* 之組織培養苗玻璃質化的程度提高；而 $MgSO_4$ 加倍則可使玻璃質化減低，且增加枝條繁殖率[16]。減少 K^+濃度，亦可使玻璃質化的發生率增高，且組織中氨基酸與還原糖因能量不足而堆積，致使蛋白質的合成減低，而使正常枝條的數目減少[20]。

本研究發現康乃馨組織培養試管苗玻璃質化雖因 agar、BA 及 NH_4^+／NO_3^- 之使用而不同，但代數間之差異則似乎影響更大。經四次繼代培養後之枝條，其玻璃質化程度明顯高於第一代者。Druart 即曾報導，在蘋果品種中，York 品種較 Vermont spur Delicious 品種不易玻璃質化；且在

蘋果組織培養中玻璃質化的發生現象，隨繼代培養的代數增加而提高；造成玻璃質化所需的繼代培養代數，則與 species，cultivar 及 clone 有關[7]。

一般而言，若玻璃質化的程度不嚴重，則可使用下列處理使其發生率降低，例如降低培養室溫度可使玻璃質化的發生降低[19]。若培養瓶置光源之上，使底層溫度較高，而上面有冷空氣流通造成溫度梯度，而使瓶內相對濕度升高，玻璃質化的發生率隨之增加；又使用大的培養容器，玻璃質化的發生率也較低[13]。使用較低濃度之 sucrose，或以 glucose 取代 sucrose，可促使葉綠體發展而降低玻璃質化的發生[13]，以 fructose 或 galactose 代替 sucrose，亦可達降低玻璃質化的效果[7]。於液體培養基中加入 glutathione-reduced，可減少玻璃質化的發生，並促進枝條的繁殖率[23]。某種 agar 水解產物 EM1 及 EM2，可抑制玻璃質化的發生[9]。將 polyethlyene、phloroglucinol 及 phloridizin 加入液體培養基，亦可降低玻璃質化的發生，但繁殖率亦隨之減少[24]。使用較高濃度的 agarose 以及 urgo pore tape 代替 parafilm，來封培養皿，可使 water potential 及相對濕度降低，而減低玻璃質化發生[13]。

一般認爲利用組織培養大量繁殖重要的花卉或園藝作物，每一培殖體所繁殖之試管苗數目，以不超過一萬株爲宜，此乃爲避免經多次繼代培養後，形成突變株之機率將大爲提高，且大量繁殖倍率亦將隨繼代培養次數之增加而降低之故；本研究發現除培養基中 agar、BA 濃度及 HN_4^+／NO_3^-比例，可影響康乃馨試管苗之玻璃質化外，同時也發現經四次繼代培養後，康乃馨試管苗之玻璃質化程度有愈形嚴重之趨勢；以每次繼代培養都可增加十倍之速度計算，經四次繼代培養後每一培殖體應可繁殖一萬株試管苗，與前人所言“每一培殖體大量繁殖數目以不超過一萬株爲宜”的原則不謀而合。

引用文獻

1. 古新梅、蔡新聲。1994。培養基組成分對康乃馨試管苗玻璃質化的影響。中華農業研究 43：51-62.
2. Beauchesne, G. 1981. Les milieux mineraux utilises en culture in vitro et leur incidence sur papparition de boutures d'aspect pathologique. C. R. Acad. Agric. Paris 67 : 1389-1397.
3. Bornman, C. H. and T. C. Vogelmann. 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in *Picea abies*. Physiol. Plant. 61 : 505-512.
4. Cachita-Cosma, D. 1989. Carnation vitrification. Agricell Report 13 : 6.
5. Debergh, P. C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plant. 59 : 270-276.
6. Debergh, P. C., Y. Harbaoui, and R. Lemeur. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) : Evaluation of different hypothesis of overcome vitrification with special reference to water potential. Physiol. Plant. 53 : 181-187.
7. Druart, P. H. 1987. Regulation of axillary branching in microprogation of woody fruit species. Acta Horti. 212 : 173-182.
8. Earle, E. D. and R. W. Langhans. 1975. Carnation propagation from shoot tips cultured in liquid medium. HortSci. 10 : 608-610.
9. Hdidfer, C. and Y. Desjardins. 1993. Prevention of shoot vitrification of strawberry micropropagated shoots proliferated on liquid medium by new antivitrifying agents. Can. J. Plant. Sci. 73 : 231-235.
10. Leshem, B. 1983. Growth of carnation meristems in vitro. Anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation. Ann. Bot. 52 : 413-415.
11. Leshem, B. 1988. Cytokinin : The primary inducer of vitrification. Agricell Report 10 : 46.
12. Letouze, R. and F. Daguin. 1983. Manifestation spontanee et aleto rie d'une croissance anormale en

culture in vitro. Recherchede marqueurs metaboliques, Rev. Can. Biol. Exp. 42 : 23-28.

13. Marc De Btock, Dirk De Brouwer and Paul Tenning. 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. Plant Physiol. 91 : 694 -701.

14. McLaughlin, J. and D. F. Karnosky. 1988. Cytokinin : The primary inducer of vitrification. Agricell Report 10 : 46.

15. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

16. Orlikowska, T. 1987. Vitrification problem in the in vitro culture of fruit tree root stocks. Acta Horti. 212 : 241-243.

17. Paques, M. 1991. Vitrification and micropropagation : causes , remedies and prospects. Acta Horti. 289 : 283-290.

18. Paques, M. and ph. Boxus. 1987. A model to learn "vitrification" : apple M26. present results. Acta Horti. 212 : 193-210.

19. Paques, M., ph. Boxus and M. Dulos. 1987. Vitrification : an induceable and reversible phenomenon. Acta Horti. 212 : 253-258.

20. Pasqualetto, P.L., R. H. Zimmerman and I. Fordham. 1998. The influence of cation and gelling agent concentration on vitrification of apple cultivars in vitro. Plant Cell Tissue Organ Culture 14 : 31-40.

21. Phan, C. T. 1991. Vitrification : cause and prevention. Agricell Report 16 : 21.

22. Riffaud, J. L. and D. Cornu. 1981. Utilisation de la culture in vitro poru la multiplication de merisiers adultes (*Prunus avium* L.) selectionnes n foret. Agronomie 1 : 633-640.

23. Standardi, A. and M. Micheli. 1988. Control of vitrification in proliferating shoots of M26. Acta Horti. 227 : 425-427.

24. Short, K. C., J. Warburton and A. V. Roberts. 1987. In vitro hardening of cultured califlower and *Chrysanthemum* plantlets to humidity. Acta Horti. 212 : 329-334.

25. Vieitez, A. M., A. Ballester and E. Vieitez. 1987. Vitrification in chestnut shoots regenerated in vitro. Acta Horti. 212 : 231-234.

26. Vieitez, A. M., A. Ballester, M. C. San-Jose and E. Vieitez.1985. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro. Physiol. Plant. 65 : 177-184.

27. von Arnold, S. V. and T. Eriksson. 1984. Effect of concentration of agar on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L.). Plant Cell Tissue Organ Culture 3 : 257-264.

28. Ziv, M. 1990. Transition of plants from in vitro cultures to establishment in vivo. Agricell Report 15 : 3.

29. Ziv, M., G. Meir, and A. H. Halevy. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plentlets in vitro. Plant Cell Tissue Organ Culture 2 : 55-65.

Influence of Subculture Generation on the Vitrification of Carnation Plantlets Culture *In Vitro*[1]

Hsin-Mei Ku and Hsin-Sheng Tsay[2]

Summary

Vitrification is a commonly observed phenomenon in tissue culture-derived carnation plantlets, which is detrimental to the successful transplanting of these plantlets to the field. The purpose of this study was to evaluate the combined effects of medium composition and subculture generation on the degree of vitrification in carnation plantlets derived from shoot-tip culture. It was found that the percentage of plantlet vitrification was significantly higher with reduced agar concentration or increased BA concentration or NO3－ : NH4＋ ratio in the medium. Similar results were obtained when shoot tips from both first and fourth generations were used for the experiments. Nevertheless, plantlets of the fourth generation showed severer vitrification than those of the first generation. It was concluded that using carnation shoot tips of less subculture generation, in combination with improved medium composition, were beneficial for preventing the plantlet vitrification.

Key words : *Dianthus caryophyllus* L., Tissue culture, Vitrification.

1. Contribution No. 1732 from Taiwan Agricultural Research Institute.
2. Respectively, Research Assistant and Senior Agronomist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.